

氏名(本籍)	お だ あき こ 織 田 彰 子 (富 山 県)			
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	博 甲 第 5824 号			
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	アルツハイマー病脳に蓄積するアミロイドβ蛋白の生成に関わるセクレターゼと酸化ストレスの関連についての研究			
主	査	筑波大学教授	博士(医学)	島 野 仁
副	査	筑波大学教授	理学博士	岡 村 直 道
副	査	筑波大学准教授	医学博士	水 上 勝 義
副	査	筑波大学講師	博士(理学)	小 林 麻己人

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease (AD)) は慢性進行性の記憶力障害を特徴とする最も頻度の高い認知症疾患である。AD は人口の高齢化に伴って近年増加しており、その病態を治療への展望を持って解明することは非常に重要である。AD の病理学的特徴の一つである老人斑には、amyloid- β 蛋白 (Ab) が凝集、蓄積しているが、現在のところ、この Ab が AD の病態の中心的因子であると考えられている。Ab はアミロイド前駆体蛋白 (amyloid precursor protein (APP)) が β セクレターゼ (β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1)) と γ セクレターゼにより段階的に切断されて生成する。 γ セクレターゼは presenilin 1 (PS1) を活性中心として少なくとも他の 3 つの蛋白質である nicastrin、anterior pharynx-defective 1 (APH-1)、presenilin enhancer 2 (PEN-2) が結合した複合体である。これまでに、Ab を増加させる因子として酸化ストレスやコレステロールが報告されてきた。さらに、脂質ラフトと呼ばれるコレステロールに富む膜微小領域が Ab の産生、蓄積に重要な役割を持っていることが示唆されてきた。また近年、酸化ストレスによりセクレターゼが変化する可能性も指摘されてきているが、現在のところ詳細は明らかでない。本研究では、酸化ストレスによる脂質ラフト内の BACE1、 γ セクレターゼの変化および Ab 産生の変化について明らかにするため、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に、酸化ストレス物質である Ethacrynic acid (EA) を負荷した培養系を用いた検討を行っている。

(対象と方法)

SH-SY5Y 細胞に、EA (10 ~ 30 μ M) を 20 時間負荷し、細胞内蛋白質をウエスタンブロット法で検討した。次に、EA (30 mM) を 20 時間負荷後、細胞を 1%CHAPS を含むバッファーで処理し、蔗糖密度勾配遠心法により分画し、脂質ラフト画分と非ラフト画分をウエスタンブロット解析した。さらに、RT-PCR 法により PS1 mRNA のレベルの解析を行った。EA による Ab 産生の変化を検討するため、スウェーデン変異型 APP を発現する SH-SY5Y 細胞 (SH-swAPP 細胞) に EA (30 mM) を 24 時間負荷後、培養上清中の Ab40, 42 レベルをサンドイッチ ELISA 法で測定した。また、抗酸化物質である N-Acetylcystein (NAC) の効果を調べる

ため、細胞を NAC (2 mM) で 8 時間前処理した後、EA (30 mM) と NAC を共負荷し、細胞内および脂質ラフト画分の PS1 蛋白レベル、PS1 mRNA、培養上清中の Ab40, 42 レベルを同様に解析した。

(結果)

細胞内蛋白質のウエスタンブロット解析の結果、EA (30mM) 負荷時に酸化ストレスマーカーである Heme-Oxygenase-1 (HO-1) 蛋白の明らかな増加が確認された。EA 負荷により、細胞内の PS1 蛋白レベルは対照の約 1.4 倍へと有意に増加したが、他の γ セクレターゼ複合体因子である nicastrin, APH-1, PEN-2 および、BACE1、APP の蛋白レベルには著変を認めなかった。蔗糖密度勾配遠心法による分画では、PS1 を含めた γ セクレターゼ複合体因子と成熟型 BACE1 は脂質ラフト画分に主に分布していた。EA 処理した細胞の脂質ラフト画分において、PS1 蛋白レベルは対照の約 1.4 倍へと有意に増加したが、他の γ セクレターゼ複合体因子および、BACE1、APP の蛋白レベルには著変を認めなかった。半定量的 RT-PCR 法による検討では、PS1 mRNA レベルは EA 負荷時に対照の約 1.4 倍へと有意に増加した。real-time PCR 法でも同様の結果を得た。SH-swAPP 細胞に EA (30 mM) を負荷した場合、培養上清中の Ab40, Ab42 のレベルが、それぞれ対照の約 2 倍、約 1.4 倍へと有意に増加した。同時に細胞内 PS1 蛋白レベルは対照の約 1.3 倍へと有意に増加した。NAC (2 mM) を EA と共処理した際には、上述の EA 負荷による HO-1 蛋白の増加が抑制されると共に、PS1 蛋白、PS1 mRNA、Ab レベルの増加も抑制された。

(考察)

本研究では、SH-SY5Y 細胞に EA を用いて酸化ストレスを負荷した際に、PS1 発現の増加を認め、脂質ラフトにおける PS1 蛋白レベルの増加を認めた。さらに SH-swAPP 細胞において EA 処理は Ab 分泌を増加させた。脂質ラフトにおける PS1 蛋白レベルの増加は、 γ セクレターゼ活性の増加につながり、その結果 Ab 産生が増加する可能性が考えられる。Ab はまた、酸化ストレスを誘導することが報告されており、上述のように酸化ストレスにより増加した Ab がまた、酸化ストレスを誘導して悪性サイクルを形成し、病態を進行させると考えられる。従って、抗酸化物質などによりこのサイクルを阻止することは AD の治療の一助になる可能性があり、さらに脂質ラフトにおける Ab 産生を標的とする治療も有効になりうると考えられる。本研究では比較的強い刺激での急性期反応を検討したが、より弱い刺激で慢性的な処理による検討も病態および治療を検討する上で有用と述べている。

(結論)

酸化ストレスは、PS1 発現を増加させ、脂質ラフトの PS1 増加を介して Ab 産生を促進する可能性が考えられた。本研究の結果は、酸化ストレスと Ab 増加の関連、および Ab 産生における脂質ラフトの重要性を支持するものであり、抗酸化物質による酸化ストレスの抑制や脂質ラフトにおける Ab 産生を標的とする治療が AD 治療に有効である可能性が示唆されるとしている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において酸化ストレス物質 Ethacrynic acid の負荷が脂質ラフトの presenilin 1 の発現を増加させ、アルツハイマー病の病因関連物質アミロイド β 蛋白の産生を増加させることを観察しており、酸化ストレスが、アルツハイマー病病態に関与する事がた価値ある報告である。また酸化ストレスの除去が治療の標的になりうる事も示唆しており興味深い。

論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。